

# Regulation of skeletal muscle mitochondrial biogenesis by GSK-3 $\beta$

Citation for published version (APA):

Theeuwes, W. F. (2020). Regulation of skeletal muscle mitochondrial biogenesis by GSK-3 $\beta$ . [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20200403wt>

## Document status and date:

Published: 01/01/2020

## DOI:

[10.26481/dis.20200403wt](https://doi.org/10.26481/dis.20200403wt)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Skeletal muscle tissue has a remarkably high plasticity. This is reflected by its large capacity to adapt its mass and oxidative phenotype (OXPHEN; defined as the proportion of oxidative muscle fibers and mitochondrial oxidative capacity) in response to, amongst others, changes in physical activity or muscle loading. In **Chapter 1**, the molecular pathways regulating skeletal muscle OXPHEN are introduced. This primarily encompasses the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator-1 (PGC-1) $\alpha$  signaling network which has been convincingly shown to be a pivotal pathway in the regulation of mitochondrial biogenesis not only in skeletal muscle but in a wide variety of cell types. In addition, this chapter introduces glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  and its role in the regulation of PGC-1 $\alpha$  in non-muscle cells. This led to the main objective of this thesis: 'To investigate the role of GSK-3 $\beta$  in oxidative substrate metabolism and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle'. The models that were used to investigate this are presented and physical (in)activity is introduced as one of the most potent external triggers affecting muscle OXPHEN. Furthermore, **Chapter 1** introduces the involvement of GSK-3 $\beta$  in the regulation of skeletal muscle mass, *e.g.* muscle protein turnover and post-natal myogenesis.

In **Chapter 2**, we investigated if GSK-3 $\beta$  inactivation during muscle reloading (after a period of muscle unloading) is essential for improvements in myogenesis, protein turnover signaling, PGC-1 $\alpha$  signaling and subsequent expression of oxidative phosphorylation (OXPHOS) sub-units. We address this hypothesis using whole-body constitutively active (C.A.) GSK-3 $\alpha/\beta$  knock-in and wild-type mice and investigated the soleus muscle of the hind-limb under baseline conditions, directly after 14-days of hind-limb suspension (HLS; a disuse-induced atrophy model) and during reloading of the hind-limbs. No consistent or significant alterations in reloading-induced changes in muscle mass, protein turnover, post-natal myogenesis nor in the regulation of muscle OXPHEN were observed between the two genotypes. In this chapter, we conclude that GSK-3 inactivation is dispensable for the above-mentioned processes during muscle reloading after a period of inactivity. However, subtle but consistent differences are observed at baseline between the two genotypes suggesting suppression of protein turnover signaling, PGC-1 $\alpha$  signaling and mRNA expression of several OXPHOS sub-units resulting from constitutive activation of GSK-3.

These findings led to the hypothesis that inactivation of GSK-3 $\beta$  increases gene expression of PGC-1 $\alpha$ , which subsequently induces mitochondrial biogenesis and gene expression of OXPHOS sub-units in adult muscle (**Chapter 3**). To address this hypothesis, we used pharmacological and genetic approaches to inhibit GSK-3 $\beta$  in fully differentiated C2C12 murine myotubes, as an *in vitro* analogue of myofibers. In addition, we used muscle-specific GSK-3 $\beta$  knock-out (KO) mice at baseline and

directly after 14-days of HLS. Largely in line with our findings in the C.A. GSK-3 $\beta$  knock-in mice (**Chapter 2**), overexpression of GSK-3 $\beta$  did not alter the expression of PGC-1 $\alpha$  or OXPHOS sub-units in C2C12 myotubes. However, pharmacologic and genetic inhibition of GSK-3 $\beta$  potentially increases mRNA and protein content of PGC-1 $\alpha$  and OXPHOS sub-units in C2C12 myotubes. This is accompanied by increased levels of mitochondrial (mt)DNA. Furthermore, we reveal that increased gene expression of OXPHOS sub-units mediated by inhibition of GSK-3 $\beta$  requires PGC-1 $\alpha$  by deploying double knock-down experiments. In addition, muscle-specific GSK-3 $\beta$  KO protects against unloading-induced loss of gene expression of components of the PGC-1 $\alpha$  signaling cascade and OXPHOS sub-units. In conclusion, in this chapter we identified that GSK-3 $\beta$  inactivation increases PGC-1 $\alpha$  levels in muscle cells and subsequently induces mitochondrial biogenesis and expression of sub-units of OXPHOS complexes.

Several molecular mechanisms control the oxidative capacity of the muscle during both maintenance as well as regeneration of adult skeletal muscle. Impairments in these regulatory mechanisms contribute to the development of skeletal muscle abnormalities. In **Chapter 4**, we therefore investigated if inactivation of GSK-3 $\beta$  also potentiates the PGC-1 $\alpha$  signaling cascade during myogenic differentiation and during recovery of inactivity-induced muscle atrophy. We report that GSK-3 $\beta$  inhibition increases the abundance of key constituents of the PGC-1 $\alpha$  signaling pathway and increases expression of OXPHOS sub-units during myogenic differentiation of C2C12 myoblast into myotubes, which is in line with the effects of inhibition of GSK-3 $\beta$  in fully differentiated myotubes that we describe in **Chapter 3**. Ultimately, knock-down of GSK-3 $\beta$  during myogenic differentiation results in enhanced mitochondrial respiration at the end of the myogenic differentiation program. In addition to these findings, *in vivo* experiments reveals that muscle-specific GSK-3 $\beta$  KO potentiates reloading-induced inductions in gene expression of components of the PGC-1 $\alpha$  signaling and OXPHOS sub-units after a period of inactivity. Overall, we conclude that inactivation of GSK-3 $\beta$  potentiates the PGC-1 $\alpha$  signaling, resulting in mitochondrial biogenesis and mitochondrial respiration during myogenic differentiation and muscle recovery after a period of physical inactivity.

In **Chapter 5**, we aimed to elucidate the molecular mechanism by which inactivation of GSK-3 $\beta$  increases *Pgc-1 $\alpha$*  mRNA abundance in skeletal muscle cells. We used fully differentiated C2C12 myotubes to fundamentally underpin this underlying molecular mechanism. PGC-1 $\alpha$  promoter activity enhances following inactivation of GSK-3 $\beta$  while chromatin accessibility of the PGC-1 $\alpha$  promoter remained unaltered, indicating a transcriptionally-controlled mechanism. Subsequently, several transcription factors known to be involved in the transcriptional control of PGC-1 $\alpha$  were pharmacologically

or genetically inhibited in C2C12 myotubes in order to investigate their possible involvement in transcriptional regulation of PGC-1 $\alpha$  mediated by inactivation of GSK-3 $\beta$ . Inhibition of GSK-3 $\beta$  did not alter myocyte enhancer factor 2 (MEF2) transcriptional activity, indicating that MEF2 isoforms are likely not involved in enhanced *Pgc-1 $\alpha$*  transcription mediated by inactivation of GSK-3 $\beta$ . Furthermore, while knock-down of GSK-3 $\beta$  increased estrogen-related receptor (ERR) expression levels and potentiated transcription of its down-stream targets, ERR transcription factors are not essential for increased *Pgc-1 $\alpha$*  levels mediated by inhibition of GSK-3 $\beta$ . Interestingly, inhibition of GSK-3 activity results in nuclear translocation of transcription factor EB (TFEB). Furthermore, increased *Pgc-1 $\alpha$*  gene expression and activation of the PGC-1 $\alpha$  promoter mediated by inactivation of GSK-3 $\beta$  require TFEB. In addition, mutation of a TFEB binding sequence located on the proximal PGC-1 $\alpha$  promoter blocked PGC-1 $\alpha$  promoter activation induced by inactivation of GSK-3. Overall, we report that inactivation of GSK-3 $\beta$  causes nuclear translocation of TFEB, which is required for induction of PGC-1 $\alpha$  promoter activation and subsequent transcription of the *Pgc-1 $\alpha$*  gene.

Finally, in **Chapter 6**, the overall results of this thesis are discussed and placed in a broader perspective. We review the potential role of GSK-3 $\beta$  as key node in the regulation of skeletal muscle mass and OXPHEN in the context of disease-related factors that might be associated with increased activity of GSK-3 $\beta$  in skeletal muscle including physical inactivity, malnutrition and hypoxia. From a clinical perspective, the therapeutic potential of GSK-3 $\beta$  inhibitors or TFEB agonists is highlighted to treat or prevent muscle abnormalities during ageing and in chronic diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, chronic heart failure, chronic kidney disease and type II diabetes (diseases that are often characterized by both loss of muscle mass and deterioration of muscle OXPHEN). Furthermore, we highlight our novel finding that inactivation of GSK-3 $\beta$  phosphorylates TFEB, resulting in its nuclear translocation, which results in increased promoter activation and gene expression of PGC-1 $\alpha$ . Ultimately, inactivation of GSK-3 $\beta$  potentiates skeletal muscle oxidative substrate metabolism and mitochondrial biogenesis via this process.





## **Nederlandse Samenvatting**



Onze spieren bezitten een opmerkelijk vermogen om zich aan te passen aan veranderende omstandigheden. Dit betekent dat zowel spiermassa als spiermetabolisme zich normaliter goed kunnen aanpassen aan veranderingen in onder andere fysieke activiteit of spierbelasting. Weefsels, waaronder ook de skeletspieren, bestaan uit cellen. Cellen bevatten op hun beurt verschillende celorganellen waaronder mitochondriën. Mitochondriën zijn erg belangrijk voor energieproductie door middel van substraatoxidatie, ofwel de verbranding van voedingsstoffen met behulp van zuurstof ook wel energiemetabolisme genoemd.

**Hoofdstuk 1** introduceert de moleculaire processen die mitochondriële biogenese (de aanmaak van nieuwe mitochondriën) reguleren. De peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  co-activator-1 (PGC-1) $\alpha$  signalering is essentieel voor dit proces en is onder andere betrokken bij het aansturen van de aanmaak van de zogenaamde oxidatieve fosforylering (OXPHOS) complexen. Deze OXPHOS-complexen zijn belangrijk voor de energieproductie van de cel en bevinden zich in de mitochondriën. Dit hoofdstuk zet ook de betrokkenheid van het eiwit glycogeen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  in de regulatie van PGC-1 $\alpha$  in andere celtypen uiteen en het daaruit voortvloeiende algemene doel van dit proefschrift: ‘het onderzoeken van de rol van GSK-3 $\beta$  in de regulatie van oxidatief energiemetabolisme en mitochondriële biogenese in de spier’. De betrokkenheid van GSK-3 $\beta$  in de moleculaire regulatie van spiermassa (eiwitaanmaak, -afbraak en postnatale myogenese (dat laatste is de vorming en regeneratie van spierweefsel)) wordt eveneens in **Hoofdstuk 1** besproken. Daarnaast introduceren we de experimentele modellen die we gebruikt hebben om de rol van GSK-3 $\beta$  in mitochondriële biogenese te onderzoeken. Fysieke (in)activiteit wordt daarbij gepositioneerd als belangrijke factor die energiemetabolisme in de spier kan beïnvloeden.

N

In **Hoofdstuk 2**, hebben we vervolgens onderzocht of uitschakelen van GSK-3 $\beta$  essentieel is voor de processen van myogenese, de aansturing van eiwitaanmaak en -afbraak, PGC-1 $\alpha$  signalering en de aanmaak van OXPHOS-complexen tijdens spierherstel na inactiviteit. We hebben dit onderzocht door gebruik te maken van transgene muizen waarbij een permanent actieve vorm van GSK-3 door middel van genetische modificatie is aangebracht (in het hoofdstuk aangeduid met ‘C.A. GSK-3 KI’ muizen). Deze muizen hebben vervolgens een protocol doorlopen waarbij fysieke inactiviteit werd gesimuleerd door 14 dagen de achterpoten te ontlasten door muizen op te hangen aan hun staart. Om spierherstel te stimuleren zijn deze muizen vervolgens teruggeplaatst op hun achterpoten. We vonden geen uitgesproken verschillen tussen de gewone en transgene muizen tijdens de herstelfase. Hieruit hebben we geconcludeerd dat uitschakelen van GSK-3 niet noodzakelijk is voor boven-genoemde processen tijdens spierherstel na een periode van fysieke

inactiviteit. Daarentegen vonden we wel dat de aanmaak van onderdelen van de PGC-1 $\alpha$  signalering en OXPHOS-complexen verminderd is in de spieren van transgene muizen ten opzichte van de gewone dieren onder basale condities.

De bovenstaande bevindingen hebben geleid tot de volgende hypothese: ‘het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  in de skeletspier verhoogt PGC-1 $\alpha$  signalering, hetgeen mitochondriële biogenese en verhoogde aanmaak van de OXPHOS-complexen tot gevolg heeft’. Om deze hypothese te toetsen hebben we in **Hoofdstuk 3** gebruik gemaakt van een celkweek model van volledig gedifferentieerde spiercellen. Om de rol van GSK-3 $\beta$  in mitochondriële biogenese in de spiercel te onderzoeken hebben we de activiteit van GSK-3 $\beta$  farmacologisch geremd of het GSK-3 $\beta$  eiwit verwijderd. Ook hebben we transgene muizen gebruikt waarbij het GSK-3 $\beta$  eiwit door middel van genetische modificatie is verwijderd uit de skeletspier (in het hoofdstuk aangeduid met ‘GSK-3 KO’) en deze spieren geanalyseerd vóór en ná 14 dagen inactiviteit (zoals hierboven beschreven). Farmacologische remming en genetische verwijdering van GSK-3 $\beta$  verhoogden de aanmaak van zowel PGC-1 $\alpha$  als de OXPHOS-complexen in deze spiercellen. Ook was de hoeveelheid mitochondrieel DNA (mtDNA; een veelgebruikte maat voor de hoeveelheid mitochondriën in de cel) verhoogd. Deze verhoogde aanmaak van OXPHOS-complexen na het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  was afhankelijk van de aanwezigheid van PGC-1 $\alpha$ . Tevens waren de dieren zonder het GSK-3 $\beta$  eiwit in de spier beschermd tegen een door fysieke inactiviteit geïnduceerd verlies van belangrijke spelers in de PGC-1 $\alpha$  signalering en de OXPHOS-complexen. Hierdoor hebben we geconcludeerd dat uitschakelen van GSK-3 $\beta$  leidt tot een verhoogde aanmaak van het PGC-1 $\alpha$  in de spier, hetgeen vervolgens mitochondriële biogenese en daarmee een vermeerdering van de hoeveelheid OXPHOS-complexen tot gevolg heeft.

Het onderhouden van de spieren en spierherstel zijn beide belangrijk voor het intact houden van gezonde skeletspieren. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 4** onderzocht of het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  tijdens myogene differentiatie (als onderdeel van spierontwikkeling) en spierherstel na een periode van inactiviteit ook leidt tot verhoging van PGC-1 $\alpha$  signalering, mitochondriële biogenese en aanmaak OXPHOS-complexen. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van gekweekte spiercellen tijdens het proces van myogene differentiatie en hebben we de muizen zonder het GSK-3 $\beta$  eiwit in de spier gebruikt die na 14 dagen inactiviteit teruggeplaatst zijn op hun achterpoten om spierherstel te stimuleren. Net als in de gedifferentieerde spiercellen leidde uitschakelen van GSK-3 $\beta$  tijdens myogene differentiatie tot een verhoging van belangrijke spelers van de PGC-1 $\alpha$  signalering alsook de aanmaak van OXPHOS-complexen. Aan het einde van de myogene differentiatie resulteerde

uitschakelen van GSK-3 $\beta$  tot een verhoogd mitochondrieel zuurstofverbruik wat duidt op een verbeterde functie van de mitochondriën. Tijdens de herstelfase (dus bij het weer belasten van de achterpoten) namen de PGC-1 $\alpha$  signalering en de aanmaak van OXPHOS-complexen sterker toe in de muizen zonder GSK-3 $\beta$  in de spier vergeleken met de controledieren. Hierdoor concluderen we dat uitschakelen van GSK-3 $\beta$  tijdens spierherstel leidt tot een verhoogde mitochondriële biogenese en een verbeterde mitochondriële functie.

In **Hoofdstuk 5** hebben we getracht te ontrafelen hoe het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  nu precies leidt tot een verhoging van de aanmaak van PGC-1 $\alpha$  in de spiercellen. Hiervoor hebben we wederom gebruik gemaakt van volledig gedifferentieerde spiercellen. Naast een verhoogde aanmaak van PGC-1 $\alpha$  leidde het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  ook tot een verhoogde activiteit van de PGC-1 $\alpha$  promoter (een stukje DNA dat de aanmaak van PGC-1 $\alpha$  reguleert). Om dit verder te onderzoeken hebben we de betrokkenheid van verschillende transcriptiefactoren, waarvan bekend was dat deze aan de PGC-1 $\alpha$  promoter kunnen binden en vervolgens diens aanmaak kunnen beïnvloeden, onder de loep genomen. Dit is gedaan door middel van farmacologische remming en genetische verwijdering van deze transcriptiefactoren. Hierdoor hebben we de betrokkenheid van verschillende transcriptiefactoren (myocyte enhancer factor 2 (MEF2) en estrogen-related receptor (ERR)) uitgesloten. Het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  zorgt er wel voor dat een andere transcriptiefactor (transcriptie factor EB (TFEB)) geactiveerd wordt. Door het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  kan TFEB namelijk naar de celkern (de plaats in de cel waar de aanmaak van genen gereguleerd wordt) migreren. Hierdoor kan TFEB aan de PGC-1 $\alpha$  promoter binden, wat de aanmaak van PGC-1 $\alpha$  tot gevolg heeft. Hieruit concluderen we dat het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  resulteert in de translocatie van TFEB naar de celkern. Dit is noodzakelijk voor de activatie van de PGC-1 $\alpha$  promoter en de aanmaak van PGC-1 $\alpha$ .

In **Hoofdstuk 6** worden de resultaten van dit proefschrift besproken aan de hand van de meest recente wetenschappelijke literatuur en worden de resultaten in breder perspectief geplaatst. In dit hoofdstuk wordt GSK-3 $\beta$  als sleutelspeler in de regulatie van spiermassa en spiermetabolisme gepresenteerd. Verschillende aspecten van chronische ziekten die mogelijk geassocieerd zijn met een verandering van de activiteit van GSK-3 $\beta$  in de skeletspieren worden belicht. Vanuit een klinisch perspectief geeft dit het therapeutische potentieel aan van farmaceutica die GSK-3 $\beta$  kunnen remmen of TFEB kunnen activeren om spierafwijkingen (zoals verlies van spiermassa en/of -metabolisme) te verhelpen of te voorkomen bij patiënten waarbij de spiermassa is verminderd en/of de spierstofwisseling is aangedaan zoals patiënten met een chronische longziekte, chronisch hartfalen en bij ouderen. De

algemene conclusie van dit proefschrift is dat het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  leidt tot aanmaak van PGC-1 $\alpha$  via TFEB in spiercellen. De verhoogde aanmaak van PGC-1 $\alpha$  na het uitschakelen van GSK-3 $\beta$  gaat gepaard met een verhoging van het oxidatieve energiemetabolisme en de mitochondriële biogenese.

